

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/001882

International filing date: 09 February 2005 (09.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-061798  
Filing date: 05 March 2004 (05.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 31 March 2005 (31.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

09. 2. 2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 4 年   3 月   5 日  
Date of Application:

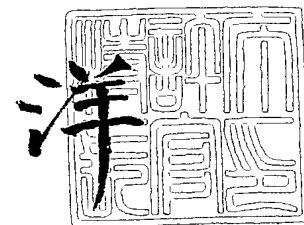
出 願 番 号            特 願 2 0 0 4 - 0 6 1 7 9 8  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 4 - 0 6 1 7 9 8 ]

出      願      人            日 清 紡 績 株 式 会 社  
Applicant(s):

2 0 0 5 年   3 月 1 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号   出証特 2 0 0 5 - 3 0 2 4 2 6 5

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P-B1674  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G01N 33/53  
【発明者】  
    【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台 1 - 2 - 3 日清紡績株式会社 研究開  
                        発センター内  
    【氏名】 秋山 めぐみ  
【発明者】  
    【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台 1 - 2 - 3 日清紡績株式会社 研究開  
                        発センター内  
    【氏名】 木村 直紀  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000004374  
    【氏名又は名称】 日清紡績株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100100549  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 川口 嘉之  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100090516  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 松倉 秀実  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100089244  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 遠山 勉  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 192372  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

固定化生体分子（ただし、核酸を除く）を用いた該生体分子と相互作用し得る物質の検出法に用いられる固定化される生体分子であって、生体分子の一部に、不飽和結合を有する化合物を含むポリマーが結合した生体分子。

**【請求項 2】**

前記ポリマーの平均重合度が 2 以上で 1 0 0 0 0 0 0 以下である請求項 1 記載の生体分子。

**【請求項 3】**

前記ポリマーを構成するモノマーがヌクレオチドである請求項 2 記載の生体分子。

**【請求項 4】**

前記生体分子が、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド及び酵素から選ばれる請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の生体分子。

**【請求項 5】**

生体分子固定化用基材と、この基材上に固定化された請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の生体分子とを有する生体分子固定化基材。

**【請求項 6】**

生体分子固定化用基材と請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の生体分子を接触させ、接触部に電磁波を照射することを含む生体分子固定化基材の製造法。

**【請求項 7】**

固定化生体分子を用いた該固定化生体分子と相互作用し得る物質の検出法において、請求項 5 記載の生体分子固定化基材を用いることを特徴とする固定化生体分子と相互作用し得る物質の検出法。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】固定化生体分子及び生体分子と相互作用し得る物質の検出法

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、固定化生体分子を用いた該生体分子と相互作用し得る物質の検出に関し、詳しくは、固定化生体分子を用いた該生体分子と相互作用し得る物質の検出法、並びに同方法に用いる生体分子及び生体分子固定化基材に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

従来、ハイブリダイゼーションによる核酸の分析や、イムノアッセイ等においては、核酸やタンパク質を膜や平板などの担体に固定化する技術が利用されており、これらの技術の中でタンパク質の固定化法として以下のものが知られている（非特許文献1）。

## 【0003】

(1) ニトロセルロースメンブレンあるいはポリーL-リジン上にタンパク質を物理的に吸着させる方法。

(2) ガラス等の基板表面にアルデヒド基あるいはエポキシ基を導入した基板を作製し、これら官能基とタンパク質のアミノ基を反応させ、固定する方法。

(3) 金基板上に二官能チオールアルキレンを用いてタンパク質を固定する方法。

## 【0004】

しかしながら、(1)の方法では固定反応に物理吸着を利用しているため、タンパク質が基材から剥がれやすく、また、非特異的な吸着により高いバックグラウンドノイズが観測される欠点がある。

## 【0005】

また、(2)の方法では、共有結合を形成するためタンパク質が基材表面から剥がれる欠点を克服できるが、固定反応を行う場合に有害な還元剤等の試薬を必要とし、また、再現性のあるデータを得るためには熟練の操作を必要とする。

## 【0006】

さらに、(3)の方法では、金-チオール間の結合が物理吸着であることやチオール基自体の安定性が乏しいことが再現性のある定量的なデータを得ることを困難にしている。

## 【0007】

また、核酸の固定化法として核酸にヌクレオチドポリマー等を結合させ、紫外線照射等により固定化用基材に結合させる技術が知られている（特許文献1）。

## 【0008】

【非特許文献1】Zhu, H. and Snyder, M. (2003) Protein chip technology. Curr. Opin. Chem. Biol. 7, 55-63.

【特許文献1】特開2001-281246号公報

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0009】

本発明は、基材上に生体分子を簡便に効率よく、かつ、簡易に固定化する方法、及び同方法を用いた生体分子と相互作用し得る物質の検出を高感度で行う方法、及びこの方法に用いる生体分子及び生体分子固定化基材を提供することを課題とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0010】

上記課題を解決するため、検討を行った結果、生体分子の一部に、不飽和結合を有する化合物を含むポリマーが結合した生体分子が、強固に固定化できること、さらにこのようにして生体分子を基材に固定化したものを用いると、該生体分子と相互作用し得る物質の検出感度を向上できることを見出し、本発明の完成に至った。

## 【0011】

すなわち本発明は、以下の通りである。

(1) 固定化生体分子（ただし、核酸を除く）を用いた該生体分子と相互作用し得る物質の検出法に用いられる固定化される生体分子であって、生体分子の一部に、不飽和結合を有する化合物を含むポリマーが結合した生体分子。

(2) 前記ポリマーの平均重合度が2以上で100000以下である(1)記載の生体分子。

(3) 前記ポリマーを構成するモノマーがヌクレオチドである(2)記載の生体分子。

(4) 前記生体分子が、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド及び酵素から選ばれる(1)～(3)のいずれかに記載の生体分子。

(5) 生体分子固定化用基材と、この基材上に固定化された(1)～(4)のいずれかに記載の生体分子とを有する生体分子固定化基材。

(6) 生体分子固定化用基材と(1)～(4)のいずれかに記載の生体分子を接触させ、接触部に電磁波を照射することを含む生体分子固定化基材の製造法。

(7) 固定化生体分子を用いた該固定化生体分子と相互作用し得る物質の検出法において、(5)記載の生体分子固定化基材を用いることを特徴とする固定化生体分子と相互作用し得る物質の検出法。

#### 【発明の効果】

##### 【0012】

本発明により、安定に基材または基材上の担体上に固定化できる生体分子が提供される。任意の生体分子の一部にポリマーを付加することにより、基材または基材上の担体上に固定できる任意の生体分子の量を増やすことができるため、検出感度を向上できる。

##### 【0013】

さらに、タンパク質が強固に基材または基材上の担体に結合できるため、タンパク質固定化基材は、再現性、定量性に優れたプロテインチップ等としての用途に有効なタンパク質固定化基材となり得る。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0014】

以下に、本発明の実施の形態を詳細に説明する。

##### 【0015】

#### <1>生体分子

本発明の生体分子は、その一部に、不飽和結合を有する化合物を含むポリマーが結合した生体分子である。生体分子としては、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド及び酵素等が挙げられる。

以下、生体分子としてタンパク質を例として説明するが、分子の一部に不飽和結合を有する化合物を含むポリマーを結合させること以外は、他の物質でも通常固定化に用いられている方法や条件を採用して本発明を実施することができる。

本発明のタンパク質は、一部にポリマーが結合していること以外は、通常の固定化（固相化）タンパク質を用いた固定化タンパク質と相互作用し得る物質の検出法（例えば、免疫アッセイ等）等に用いられる固定化タンパク質と特に変わることは無く、タンパク質と相互作用し得る物質との結合が可能なタンパク質であれば特に制限されず、例えば、天然又は合成のタンパク質が挙げられる。また、タンパク質の大きさは、タンパク質と相互作用し得る物質との結合が可能な大きさであれば特に制限されない。

##### 【0016】

タンパク質の一部とは、タンパク質のアミノ末端又はカルボキシ末端、側鎖アミノ基、側鎖カルボキシキル基、側鎖チオール基等の部分である。

##### 【0017】

上記のようなタンパク質の一部、例えばタンパク質のアミノ末端部にポリマーを結合する方法としては、公知の方法を用いることができる。具体的には、例えば、市販されているペプチド合成機を用いて、目的とするペプチドを合成する。ポリマーを構成する化合物として、市販されている核酸合成機を用いて、チミン、ウラシル等の核酸塩基を有するヌクレオチドが少なくとも2塩基以上重合したヌクレオチドを合成し、市販のアミノ基導入

試薬を用いてアミノ基を導入する。前記ペプチドとアミノ基が導入されたヌクレオチドを、市販のクロスリンク試薬（例えば、DSS (Disuccinimidyl suberate) 等）を用いて、常法に従って結合させることによる方法等が挙げられる。

#### 【0018】

また、糖にポリマーを結合する方法としては、例えば、以下の方法等が挙げられる。具体的には、例えば、グルコースの6位の水酸基をトリチル基で保護した後、残りの水酸基をアセチル化し、6位にアジド基を導入した後、アミノ基に変換する。次いで、アミノ化グルコースにDSSを大過剰量加え、精製する。次いで、例えば、上記のように合成した5'末端あるいは3'末端アミノ基が導入されたポリチミン、ポリウラシル等のヌクレオチドを、上記アミノ化グルコースのスクシニミジル基に反応させる。ナトリウムメトキシドを用いて脱アセチル化を行い、ポリマーが導入されたグルコースを合成する。

#### 【0019】

不飽和結合を有する化合物を含むポリマーとは、ポリマーを構成するモノマーの少なくとも一つが不飽和結合を有する化合物を含むポリマーを意味する。不飽和結合を有する化合物は、タンパク質がタンパク質固定化用基材に固定化されるのに十分に含まれていればよいが、ポリマーを構成するモノマーの全てが不飽和結合を有する化合物を含むことが好ましい。なお、「不飽和結合を有する化合物を含む」とは、不飽和結合を含む化合物の残基からなる又は該残基を含むことを意味する。

#### 【0020】

ポリマーの長さとしては、その平均重合度が2～1000000が好ましく、5～100000がより好ましく、7～1000が特に好ましい。

#### 【0021】

この平均重合度が1以下であると、十分な量のタンパク質を担体上に固定できないことがあり、また、重合度が1000001以上であると、立体障害のため標的分子がタンパク質に接近できず、測定を妨げることがある。

#### 【0022】

ポリマーとしては、具体的には、アデニン、アデニン誘導体、シトシン、シトシン誘導体、グアニン、グアニン誘導体、チミン、チミン誘導体、ウラシル、ウラシル誘導体を塩基として有するヌクレオチド、アクリル酸又はメタクリル酸のエステル系モノマー、スチレン系モノマー、ポリオレフィン系モノマー、ビニル系モノマー、ニトリル系モノマー、エチレングリコールジアクリレート、エチレングリコールジメタクリレート、テトラエチレングリコールジアクリレート、トリメチロールプロパントリアクリレート、テトラメチロールプロパントテトラアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタアクリレート等から選ばれるモノマーが含まれるポリマーが挙げられ、ポリマー中の上記モノマーの種類は同一又は異なってもよい。好ましいモノマーはヌクレオチドであり、特に好ましいモノマーはチミン、ウラシルである。

#### 【0023】

##### <2>タンパク質固定化用基材

本発明のタンパク質固定化用基材に用いる基材は、物理的吸着又は化学結合によってタンパク質を固定化することができ、通常の固定化タンパク質を用いた固定化タンパク質と相互作用し得る物質の検出法等の条件に耐えうるものであれば特に制限されない。具体的には、タンパク質の固定及び固定化タンパク質と相互作用し得る物質の検出法等に用いる溶剤に不溶であり、かつ常温若しくはその付近の温度範囲内（例えば0～100℃）で固体又はゲル状であるものが挙げられる。尚、基材が溶剤に不溶性であるとは、基材に後述のようにしてカルボジイミド基等のタンパク質に結合性を有する基を有する担体が担持され、次いでタンパク質が固定化され、その後、例えば、プロテインチップ等として使用される際の各過程で用いられる水性溶剤、有機溶剤等の各種溶剤に実質的に不溶性であることをいう。

#### 【0024】

このような基材の材質として、具体的には、プラスチック、無機高分子、金属、セラミ

ック等が挙げられる。

【0025】

上記プラスチックとして具体的には合成樹脂（熱可塑性樹脂、熱硬化性樹脂、共重合体等）及び天然樹脂を挙げることができる。

【0026】

より具体的に、熱可塑性樹脂としては、ポリカルボジイミド、アイオノマー（スチレン系、オレフィン系）、ポリノルボルネン、ポリアセタール、ポリアリレート、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエチレンオキシド、ポリオキシメチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリパラメチルスチレン、ポリアリルアミン、ポリフェニレンエーテル、ポリフェニレンサルファイド、ポリブタジエン、ポリブチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリメチルペンテン、ポリエーテルスルホン、ポリフェニレンスルフィド、ポリオキシベンゾイル、ポリオキシエチレン、酢酸セルロース、ポリジメチルシロキサン、ポリイソブチレン、セルローストリアセート、ポリ-p-フェニレンテレフタラミド、ポリイソブレン、ポリアクリロニトリル、ポリメチルペンテン、塩素プラスチック（ポリ塩化ビニル、ポリ塩化エチレン、塩素化ポリプロピレン、ポリ塩化ビニリデン）、フッ素プラスチック（テトラフルオロエチレン、ポリクロロトリフルオロエチレン、ポリフッ化ビニリデン）、ポリアミド（ナイロン6、ナイロン66）、ポリアミドイミド、ポリイミド（熱可塑性ポリイミド、ポリエーテルイミド）、ポリエチレンプラスチック（塩素化、高密度、低密度）、ポリビニルプラスチック（ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリパラビニルフェノール、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルブチラール、ポリビニルホルマール）、液晶ポリマー（ポリエステル系液晶高分子）、アクリレートプラスチック（アミノポリアクリルアミド、ポリメチルメタクリレート、エチルポリメタクリレート、ブチルポリメタクリレート）、熱可塑性エラストマー（スチレン系、オレフィン系、ウレタン系、ポリエステル系、ポリアミド系、1, 2-ポリブタジエン系、塩化ビニル系、フッ素系、ポリアイオノマー系、塩素化ポリエチレン系、シリコン系）等を挙げることができる。

【0027】

より具体的に、熱硬化性プラスチックとしては、エポキシ、ポリキシレン、ポリグアナミン、ポリジアリルフタレート、ポリビニルエステル、ポリフェノール、不飽和ポリエステル、ポリフラン、ポリイミド、ポリウレタン、ポリマレイン酸、メラミン、ユリア、アルキド、ベンゾグアナミン、ポリシアナート、ポリイソシアナート等を挙げることができる。

【0028】

また、プラスチックとしては、共重合体を用いることもでき、より具体的に、共重合体としては、イソブチレン無水マレイン酸共重合体、アクリロニトリルアクリレートスチレン共重合体、アクリロニトリルEPDMスチレン共重合体、アクリロニトリルスチレン共重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、ブタジエンスチレンメチルメタクリレート共重合体、エチレン塩化ビニル共重合体、エチレン酢酸ビニル共重合体、エチレンエチルアクリレート共重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、ポリエーテルエーテルケトン共重合体、フッ化エチレンポリプロピレン共重合体、テトラフルオロエチレンパーフロロアルキルビニルエーテル共重合体、テトラフルオロエチレンエチレン共重合体等を挙げることができる。

【0029】

さらに、より具体的に、天然樹脂としては、セルロース、ロジン、コーバル、ダンマル、カナダバルサム、エレミ、サンダラック、グッタベルカ、ウルシ、シュラック、コハク、じん皮繊維、葉脈繊維、果実繊維、獣毛繊維、蕁繊維、羽毛繊維、キチン、キトサン、石綿、アスベスト及びこれらの誘導体等を挙げることができる。

【0030】

また、上記合成樹脂に、染料、発色剤、可塑剤、顔料、重合禁止剤、表面改質剤、安定剤、密着性付与剤、熱硬化剤、分散剤、紫外線劣化防止剤等を必要に応じて添加した合成



樹脂を用いることができる。さらに、前記合成樹脂としては、形状を保持するために異なる種類の前記合成樹脂を積層させていてもよく、単一合成樹脂であってもよい。また、前記合成樹脂を2種類以上混合したポリマーアロイであってもよい。

**【0031】**

また、無機高分子として具体的には、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル及びグラファイト等が挙げられる。

**【0032】**

また、金属として好ましくは、周期律表第2周期～第7周期のI、II、III、IV、V、VI、VII、VIII族および遷移元素から選ばれる金属、又は同金属を含む合金が挙げられる。

**【0033】**

上記周期律表第2周期～第7周期のI、II、III、IV、V、VI、VII、VIII族および遷移元素から選ばれる金属として特に好ましいものとしては、アルミニウム、チタン、白金、タングステン、モリブデン、金、銅、ニッケル等が挙げられる。

**【0034】**

また、上記合金として具体的には、洋白（成分：Cu, Ni, Zn）、真鍮（成分：Cu, Zn）、ブロンズ（成分：Cu, Be）、モネル（成分：Cu, Ni, Fe, Mn）、ニッケルコバルト合金（成分：Ni, Co）、ニッケルクロム合金（成分：Ni, Cr）、コバルト合金（成分：Co, Ni, Cr）、ステンレス（成分：Ni, Cr, Fe）、銀タングステン（成分：Ag, W）、bチタン（成分：Ti, V, Al）、abチタン（成分：Ti, V, Al）、NT合金（成分：Ti, Ni）、アルミニウム合金（成分：Al, Cu, Mg, Si, Mn, Zn）、ジュラルミン（成分：Al, Cu, Si, Fe, Mn, Mg, Zn）、マグネシウム合金（成分：Mg, Al, Zn）、K24（成分：Au）、K18（成分：Au, Ag, Cu）、ベリリウム銅（成分：Cu, Be）、铸铁（成分：Fe, Mn, S, C）、炭素鋼（成分：Fe, C, Si, Mn, P, S）、青銅鑄物（成分：Cu, Sn, Zn, Pb）、りん青銅鑄物（成分：Cu, Zn, P）、黄銅鑄物（成分：Cu, Zn, Pb）、マンガン黄銅（成分：Cu, Zn, Mn, Fe, Al）、シルジン青銅鑄物（成分：Cu, Si, Zn）、アルミニウム青銅鑄物（成分：Cu, Al, Fe, Ni, Mn）、エリンバー（成分：Ni, Cr, Mn）、エリンバーエクストラ（成分：Ni, Cr, Co, Mn）、インバー（成分：Ni, Fe）、スーパーインバー（成分：Fe, Ni, Co）、ステンレスインバー（成分：Fe, Co, Cr）、Malottes（成分：Sn, Bi, Pb）、リポウィッツ（Lipowitz）（成分：Sn, Bi, Pb, Cd）、ウッズ（Wood's）（成分：Sn, Bi, Pb, Cd）、マンガニン（成分：Cu, Mn, Ni, Fe）、イザベリン（成分：Cu, Mn, Al）、コンスタンタン（成分：Cu, Ni）、アルクレス（成分：Fe, Cr, Al）、カンタル（成分：Cr, Fe, Al, Co）、アルメル（成分：Ni, Al）、磁性材料（Fe, Ni, Co等強磁性遷移元素を含む材料）、パーマロイ（成分：Fe, Ni）、アルパーム（成分：Fe, Al）、フェライト（Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>を主成分とする複合酸化物）、センダスト（成分：Fe, Si, Al）、スーパーセンダスト（成分：Fe, Si, Al, Ni, Co）、アルニコ（成分：Fe, Al, Ni, Co）、水素吸蔵金属（ランタンニッケル合金（成分：La, Ni）等）、Co-Cr系合金、SnO<sub>2</sub>系酸化物、Nb-Ti合金、制振合金（振動を低減もしくは吸収、振動の伝播を遮断する合金材料、Al-Zn超塑性合金、サイレントアロイ、ニチノール等）、電極用材料、半導体材料（シリコン、ゲルマニウム、カリウムヒ素等）等が挙げられる。

**【0035】**

また、前記金属は、他の金属で蒸着又はメッキ処理（加工）されていてもよい。さらに、前記金属は、形状を保持するために異なる種類の前記金属を積層させていてもよく、単一金属であってもよい。

**【0036】**

本発明における基材として上記金属を用いる場合、基材が金属のみから構成されていてもよいし、非金属材料上に金属が接着、蒸着又はメッキ等により積層されていてもよい。

**【0037】**

また、セラミックとして具体的には、アパタイト、アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ素及び炭化ホウ素等が挙げられる。

**【0038】**

上記基材の形状は、特に問われないが、箔（フォイル）状、平板（プレート）状、薄片（ウェーハ）状、フィルター状、ビーズ状等が挙げられる。また、マイクロタイタープレートのような形状であってもよい。さらに、得られる結果の保存を容易にするため、平板等の裏面をシール等に使用できる材料（接着剤等）を塗布、コート等を行うことによって、シールとしても使用することもできる。また、それらの大きさについては、特に制限は無い。

#### 【0039】

上記基材にタンパク質を固定化するに当たって、基材にタンパク質を直接固定化してもよく、担体を基材に担持させて、担体を介してタンパク質を基材に固定化してもよい。担体としては、担体自体がタンパク質に結合性を有してもよく、タンパク質に結合性を有するリガンドを介してタンパク質を固定化できるものであってよい。ここで、「担持」とは、担体にタンパク質を固定化する際やタンパク質固定化基材をプロテインチップ等として使用する際に用いられる水溶性溶剤、有機溶剤等の各種溶剤中で、基材から上記担体を実質的に脱離しないことを意味する。

#### 【0040】

本発明に用いられる上記担体は、上記基材上に担持される限り、単に物理的な接着性を利用して担持されていてもよく、また、化学的に共有結合等を介して担持されていてもよい。また、上記担体は、必要に応じ、基材上の全面において担持されても、また、その一部において担持されてもよい。

#### 【0041】

担体としては、有機低分子、プラスチック、無機高分子、金属、セラミック等が挙げられる。

#### 【0042】

上記有機低分子として具体的には、ポリリジン、3-アミノトリエトキシアミノシラン、3-アミノトリメトキシアミノシラン等の一級アミノ基を有するシランカップリング剤、マレインイミド、スクシンイミドエステル等のイミド基含有化合物、カルボジイミド基含有化合物、イソシアネート基含有化合物、イソチオシアネート基含有化合物、窒素イペリット基含有化合物、アルデヒド基含有化合物、アミノ基含有化合物、カルボキシル基含有化合物、ハロゲン含有化合物等が挙げられる。

#### 【0043】

また、プラスチックとして具体的には、基材材料として上記したような合成樹脂（熱可塑性樹脂、熱硬化性樹脂、共重合体等）及び天然樹脂を用いることができる。

#### 【0044】

また、無機高分子として具体的には、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル及びグラファイト等が挙げられる。

#### 【0045】

また、金属として好ましくは、基材材料として上記したような周期律表第2周期～第7周期のI、II、III、IV、V、VI、VII、VIII族および遷移元素から選ばれる金属、又は同金属を含む合金を用いることができる。

#### 【0046】

上記周期律表第2周期～第7周期のI、II、III、IV、V、VI、VII、VIII族および遷移元素から選ばれる金属として特に好ましいものとしては、アルミニウム、チタン、白金、タングステン、モリブデン、金、銅、ニッケル等が挙げられる。

#### 【0047】

また、セラミックとして具体的には、アパタイト、アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ素及び炭化ホウ素等が挙げられる。

#### 【0048】

このような担体は、上記基材に対して高い接着性を有するものであり、この接着性を利用して基材に担持されるものである。尚、前記担体が基材上に物理的な接着性を利用して担持される際の代表的な形態は皮膜である。

## 【0049】

前記基材上に前記担体を皮膜で担持させる方法としては、スプレー、浸漬、ブラッシング、スタンプ、蒸着、フィルムコータを用いたコーティング等の公知の方法を用いることができる。

## 【0050】

例えば、ガラス基材の表面全体にカルボジイミド基（樹脂）を導入する方法については、まず、3-アミノプロピルトリエトキシシラン等のアミノ置換オルガノアルコキシシランを適当な溶媒に溶解して得られた溶液に70～80℃程度の温度条件下でガラス基材を概ね2～3時間程度浸漬した後、これを取り出して水洗し、さらに、100～120℃程度で約4～5時間加熱乾燥する。乾燥後、適当な溶媒中に浸し、カルボジイミド樹脂を加え30～170℃程度の温度条件下で12時間程度攪拌し、洗浄すればよい。また、上記3-アミノプロピルトリエトキシシランのアミノ基と窒素イペリット基のタンパク質結合基以外の官能基を適当な溶媒を用いて反応させ、ガラス基材の表面に窒素イペリット基を導入することもできる。

## 【0051】

また、ガラス基材にアミノ基以外の官能基を導入する場合や、基材がガラス以外の材料からなる場合においても、上記基材の説明で挙げた各種材料表面に種々の官能基を導入することは、従来より一般的に行われていることであり、その方法も公知であるので、このような公知の方法を用いて基材表面への官能基の導入を行うことができる。

## 【0052】

さらに、上記で挙げた基材のプラスチック基材の中には、基材表面に既に上記のような官能基を有するものも有り、この場合には基材表面に官能基を導入することなしに、これをそのまま担体の製造に用いることも可能である。また、このようなプラスチック基材であってもさらに官能基を導入して上記担体の製造に用いることも可能である。

## 【0053】

また、上記担体または基材、あるいは担体及び基材の材料に公知の光重合開始剤を混合することもできる。光重合開始剤を混合することによって、紫外線等の電磁波の照射によるタンパク質の固定化の際の反応性が向上し得る。

## 【0054】

## &lt;3&gt;タンパク質固定化基材

上記担体の所定の位置に、タンパク質の溶液をスポットする。タンパク質としては、上記<1>で挙げたタンパク質が特に制限無く挙げられる。

## 【0055】

タンパク質を溶解する溶媒も特に制限されず、蒸留水、又は通常タンパク質溶液の調製に用いられる緩衝液、例えばTris緩衝液、PBS緩衝液（137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ）、食塩を含む水溶液等の他、カルボキシル基、スルホニル基、ホスホニル基を含む化合物から選ばれるアニオンと、アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン、オニウムイオンから選ばれるカチオンとを含む溶媒を用いることができる。同アニオンとカチオンとを含む溶媒を用いることにより、電磁波を用いてより効率よくタンパク質を担体に固定化することができる。同アニオンとカチオンとを含む溶媒として、具体的には、例えば、カルボン酸塩を含む水溶液（クエン酸ナトリウム、クエン酸アンモニウム、酢酸ナトリウム等）、スルホン酸塩を含む水溶液（ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸アンモニウム等）、ホスホン酸塩を含む水溶液等（リン酸ナトリウム、リン酸アンモニウム等）等を挙げることができる。また、タンパク質溶液の濃度も特に制限されないが、通常1 mmol/ $\mu\text{l}$ ～1 fmol/ $\mu\text{l}$ 、好ましくは100 pmol/ $\mu\text{l}$ ～100 fmol/ $\mu\text{l}$ の濃度である。

## 【0056】

タンパク質溶液を担体上にスポットする方法としては、ピペットでタンパク質溶液を担体上に滴下する方法、又は市販のスポッタを用いる方法等が挙げられる。スポットの形状及びスポット量としては、タンパク質溶液をスポットした位置を把握することができる程

度であれば、特に制限されないが、形状としては点状又は円状が好ましい。また、好ましいスポット量は10nl～10mlである。タンパク質溶液は、担体上に1箇所又は複数箇所にスポットされる。スポットされるタンパク質溶液は、1種類でも2種類又はそれ以上であってもよい。尚、担体にタンパク質が固定されたことを示す陽性コントロールとして、標識したタンパク質を固定化しておいてもよい。

#### 【0057】

タンパク質溶液を担体上にスポットした後に、電磁波、好ましくは紫外線を照射する。また、前記タンパク質溶液をスポット後紫外線照射前に乾燥させることができる。前記タンパク質溶液の乾燥方法としては、自然に乾燥させてもよく、加熱して乾燥させてもよい。加熱する場合の温度は、通常30～100℃、好ましくは35～45℃である。

#### 【0058】

担体、少なくとも担体の核酸を固定した部位に照射する紫外線としては、波長280nmの成分を含む紫外線等を好ましく挙げることができる。具体的には、波長280nmを含むブロードな波形を有する紫外線であっても良い。照射量は、累積照射量として通常20～2400mJ/cm<sup>2</sup>、好ましくは300～900mJ/cm<sup>2</sup>である。

#### 【0059】

本発明のタンパク質固定化用基材は、これを用いて分析等を行う際に、上記固定化タンパク質以外のタンパク質等を接触させる機会が多いが、基材又は基材上の担体に担持された未反応タンパク質固定部分に上記固定化タンパク質以外のタンパク質等が非特異的に結合することを防ぐため、上記のようにして点状にタンパク質を基材又は基材上の担体に固定化した後に、過剰量のウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン等を基材又は基材上の担体に接触させ、未反応タンパク質固定部分をブロックしておくことが好ましい。

#### 【0060】

本発明のタンパク質固定化基材を用いた検出法により検出される物質は、前記タンパク質固定化用基材上に固定化された固定化タンパク質と相互作用し得る物質であれば特に制限されない。なお、「相互作用」とは、固定化タンパク質とある物質間において、共有結合、疎水結合、水素結合、ファンデルワールス結合及び静電気による結合等により生じる分子間における作用であり、特に限定されない。

#### 【0061】

このようにして得られる本発明のタンパク質固定化基材は、前記タンパク質が担体に非常に強固に担持されたものであり、固定化タンパク質を用いた固定化タンパク質と相互作用し得る物質の検出法(例えば、イムノアッセイ等)等で広く使用されている洗浄方法(界面活性剤を用いた洗浄方法)によっても脱離することがなく、これを用いて分析等を行った場合、再現性及び定量性に優れた分析が可能となる。また、本発明のタンパク質固定化基材は、タンパク質が、大きさや種類に制限されずに固定され得るので、同一基材上で種々のタンパク質を同時に扱うことができる。

#### 【0062】

これらのことから、本発明のタンパク質固定化基材は、プロテインチップ(プロテインマイクロアレイ)等に優れた性能を持って適用可能であるといえる。

#### 【実施例1】

#### 【0063】

<クエン酸二アンモニウム水溶液を溶媒としたペプチド溶液の担体への固定化、ペプチド固定化担体の酵素反応による評価>

常法に従い、ペプチド合成機を用いて、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するペプチド(7残基)を合成した。さらに、配列番号2で示すチロシンをリン酸化したペプチド(7残基)も合成した。次いで、配列番号3に示すオリゴヌクレオチド(10残基)の5'末端にアミノ基を導入したオリゴヌクレオチドを定法に従い合成した。

#### 【0064】

上記合成ペプチド及び上記オリゴヌクレオチドを等モルずつリン酸バッファー(pH7.5)に溶解し、10倍モルのDSS(ピアス社製)を加えて、37℃にて2時間インキュベート

した。次いで、NAP5カラム（アマシャム バイオサイエンス社製）を用いて精製・濃縮し、45mMクエン酸二アンモニウム水溶液に溶解してペプチド溶液（1 pmol/ $\mu$ l）を調製した。

【0065】

担体上の所定の位置に、前記ペプチド溶液をスポットした。スポット量は、それぞれ0.5  $\mu$ lであり、スポット径の大きさは直径1mmであった。次いで、Uvstratalinker 2400（ストラタジーン社製）を用い、紫外線を16cmの距離から、600mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射時間は240秒であった。その後、前記担体を水中で30分間振とうし、洗浄した後に乾燥させた。

【0066】

一方、コントロールとしてペプチドを含まない溶液（クエン酸二ナトリウム水溶液）も同様に担体にスポットし、前述のような固定化の操作を行った。

【0067】

担体として、カルボジイミド基を有する高分子化合物で処理したガラス基材を用いた。

【0068】

上記ペプチド固定化担体のペプチド固定部分に、ローダミン標識抗リン酸化アミノ酸抗体を含む溶液（25mM Tris, pH 7.4, 35 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 100  $\mu$ M ATP, 2U p60）を載せ、5時間インキュベートした。ローダミン標識抗リン酸化アミノ酸抗体は、ローダミンNHS（モレキュラープロブス社製）を用いて0.1 M NaHCO<sub>3</sub>（pH 9）中でローダミンを抗リン酸化アミノ酸抗体（コスモバイオ社製）に導入したものをを用いた。次いで、上記ペプチド固定化担体を滅菌水で洗浄し、ScanArray 4000（GSI社製）を用いて蛍光を測定した。

【0069】

リン酸化ペプチドを含むスポットのみにシグナルが明瞭、かつ、特異的に検出されたことから、ペプチドが確実に固定化されていることが示された。また、コントロール（ペプチドを含まないスポット及びリン酸化されていないペプチドを含むスポット）では、蛍光を検出しなかった。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> 日清紡績株式会社(Nisshinbo Industries, Inc.)

<120> 固定化生体分子及び生体分子と相互作用し得る物質の検出法

<130> P-B1674

<160> 3

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Protein

<400> 1

Tyr Ile Tyr Gly Ser Phe Lys  
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Phosphorylation

<222> (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)

<223> Synthetic Protein

<400> 2

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr  
1 5

<210> 3

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

tttttttttt 10

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 基材上にタンパク質を簡便に効率よく、かつ、簡易に固定化する方法、同方法を用いて該タンパク質と相互作用し得る物質の検出を高感度で行う方法、ならびにこれらの方法に用いるタンパク質及びタンパク質固定化基材を提供する。

【解決手段】 固定化タンパク質を用いた該タンパク質と相互作用し得る物質の検出法において、タンパク質の一部に、不飽和結合を有する化合物を含むポリマーが結合したタンパク質であって、基材上に固定化されたタンパク質を固定化タンパク質として用いる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-061798
受付番号	50400365646
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成16年 3月 8日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成16年 3月 5日



特願 2 0 0 4 - 0 6 1 7 9 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 4 3 7 4 ]

1. 変更年月日

1 9 9 3 年 3 月 3 0 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区日本橋人形町 2 丁目 3 1 番 1 1 号

氏 名

日清紡績株式会社